

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 339—347

Vergleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von α_1 -Foetoprotein im Serum¹⁾

Von F.-G. LEHMANN und DOROTHEE LEHMANN

Medizinische Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini) Marburg/Lahn

(Eingegangen am 19. Januar/17. April 1973)

Der vergleichende serologische Nachweis von α_1 -Foetoprotein im Serum zur Diagnose primärer Leberzellkarzinome wurde für folgende immunologische Methoden untersucht: Mikro- und Makro-OUCHTERLONY-Technik, Überwanderungselektrophorese, Latex-Agglutination und passive Hämagglutination. Die Methodik und Fehlerquellen dieser Verfahren, insbesondere der passiven Hämagglutination im umgekehrten Verfahren (mit Bindung von Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG mit bis-diazotiertem Benzidin auf frische Hammelerythrocyten) in einem Mikrotiterverfahren, und die quantitative Bestimmung in der Elektroimmunodiffusion und in der radialen Immunodiffusion werden beschrieben. Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

1. Bei Titrierung mit kristallinem Antigen betragen die nachweisbaren Grenzkonzentrationen in der Doppeldiffusion 10 mg/l (Mikro-Technik) bzw. 5,2 mg/l (Makro-Technik), in der Überwanderungselektrophorese 3,6 mg/l, in der Latex-Agglutination 1,6 mg/l und in der passiven Hämagglutination 0,03 mg/l.
 2. Mit zunehmender Empfindlichkeit der Methode steigt die Anzahl positiver Ergebnisse in einem unausgewählten Krankengut bei Patienten mit primärem Leberzellkarzinom: Doppeldiffusion 58%, Latex-Agglutination 69%, Überwanderungselektrophorese 81% und passive Hämagglutination 100% positive Ergebnisse.
 3. „Falsch“-positive Ergebnisse finden sich unter 142 Patienten mit anderen Karzinomen mit oder ohne Lebermetastasen und 238 Patienten mit benignen Lebererkrankungen in folgender Häufigkeit: in der Doppeldiffusion und in der Überwanderungselektrophorese in 2,1% der Patienten mit anderen Karzinomen, jedoch nicht bei benignen Lebererkrankungen, in der Latex-Agglutination in 9,9% bei Karzinomen und in 6,6% bei akuter Virushepatitis und in der passiven Hämagglutination (Titer $\geq 1:4$) in 28,2% bei malignen Tumoren und in 10,5% bis 23,8% bei benignen Lebererkrankungen.
 4. Der Prozentsatz falsch-negativer Resultate war nur von der Empfindlichkeit der verwendeten Technik abhängig.
 5. Quantitative Bestimmungen eignen sich zur Verlaufskontrolle unter zytostatischer und nach operativer Therapie.
- Anhand der vergleichenden Untersuchungen wird die klinische Indikation der qualitativen, semiquantitativen und quantitativen Bestimmung von α_1 -Foetoprotein abgegrenzt.

Comparison of different methods for the serological determination of α_1 -foetoprotein in serum

The comparative serological determination of α_1 -foetoprotein in the serum for the diagnosis of primary liver cell carcinoma was carried out by the micro- and macro-OUCHTERLONY-technique, electroimmunoosmopheresis, latex-agglutination and passive haemagglutination. These techniques are described in detail. Particular attention is paid to the passive haemagglutination in the reversed system, — anti- α_1 -foetoprotein-IgG is bound with bis-diazotized benzidine on the surface of fresh sheep erythrocytes — in a microtiter technique, and to quantitative measurements in electroimmunodiffusion and radial immunodiffusion. The results were as follows:

1. The limits of detection of α_1 -foetoprotein in serial dilutions, using crystalline antigen, were: double diffusion, 10 mg/l (microtechnique) or 5.2 mg/l (macro-technique); electroimmunoosmopheresis, 3.6 mg/l; latex-agglutination, 1.6 mg/l; passive haemagglutination, 0.03 mg/l.
2. The percentage of positive results in patients with primary liver cell carcinoma increases with the sensitivity of the method: double diffusion 58%, latex-agglutination 69%, electroimmunoosmopheresis 81% and passive haemagglutination 100% positive results.
3. By checking 142 patients with other carcinomas with or without liver metastases and 238 patients with benign liver damage 2.1% false positives were found in patients with other carcinomas, but none were detected in benign liver damage when double diffusion and electroimmunoosmopheresis was used. Using latex agglutination, 9.9% false positives were found in carcinomas and 6.6% in acute virus hepatitis. Passive haemagglutination (titer 1:4 or higher taken as positive) gave 28.2% false positives with malignant tumours and 10.5—23.8% with benign liver damage.
4. The percentage of false negative results depends only on the sensitivity of the method employed.
5. Quantitative determinations are considered to be helpful in the follow-up of patients under cytostatic therapy or after surgical treatment. The value of the qualitative, semiquantitative and quantitative determination of α_1 -foetoprotein in clinical chemistry is discussed on the basis of this comparative study.

α_1 -Foetoprotein ist ein karzino-embryonales Tumorantigen, dessen Neosynthese in primären Leberzellkarzinomen und Teratoblastomen zur serologischen Diagnose dieser Tumoren im Serum dienen kann. Die normale Nachweismethode ist die Mikro-OUCHTERLONY-Technik mit polyvalentem, nach Absorption mit Normalserum und Leberfraktionen sekundär monospezifischem Antiserum. Arbeiten aus über 50 verschiedenen Arbeitskreisen (Übersichten bei l. c. 1, 2) zeigen, daß im Erwachsenenalter bei primären Leber-

zellkarzinomen in 50—70% und bei Teratomen und Teratoblastomen in 20% mit einem positiven serologischen Test gerechnet werden kann. Durch Steigerung der Empfindlichkeit erhielten ALPERT et al. (3) in der Überwanderungselektrophorese 22% mehr positive Resultate und ABELEV (4) fand durch Autoradiographie in 19 von 46 in der Doppeldiffusion negativen Seren von Patienten mit primären Leberzell-

¹⁾ III. Mitteilung über α_1 -Foetoprotein; I.: l. c. (5), II.: l. c. (6). Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

karzinomen α_1 -Foetoprotein. Nach Reindarstellung und Kristallisation von α_1 -Foetoprotein aus dem Plasma (5) und aus dem Tumorgewebe (6) von Patienten mit primären Leberzellkarzinomen konnten wir hochtitrige monospezifische Antiseren herstellen, die in Verbindung mit dem reinen Tumorantigen den routinemäßigen Einsatz empfindlicherer serologischer Techniken gestatten. Über Methodik, experimentelle und klinische Ergebnisse wird im folgenden berichtet. Durch Entsalzung, Lyophilisation und Einwaage kristallinen Materials steht erstmals ein kontrollierter Standard zur Verfügung; es werden Methodik, klinische Anwendung und diagnostische Bedeutung des quantitativen α_1 -Foetoprotein-Nachweises in der Elektrophorese und in der radialen Immunodiffusion untersucht. Da vergleichende Untersuchungen über verschiedene serologische Methoden mit unterschiedlicher Empfindlichkeit für α_1 -Foetoprotein zur Zeit noch nicht vorliegen, haben wir sowohl Titrationen mit kristallinem Antigen als auch klinische Untersuchungen durchgeführt, um die Bedeutung verschiedener immunologischer Techniken für das Routinelaboratorium abzugrenzen.

Material

Isolierung von α_1 -Foetoprotein

α_1 -Foetoprotein wurde aus dem Plasma von Patienten mit primären Leberzellkarzinomen nach LEHMANN, LEHMANN und MARTINI (5, 7) durch Calciumphosphatgelsorption, fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, DEAE-A 50-Sephadex-Chromatographie, Gelfiltration über Sephadex-G 100 und Immunabsorption mit löslichem IgG oder unlöslichen quervernetzten polymeren IgG isoliert. Die Reinheit in der Polyacrylamidgelelektrophorese betrug mindestens 97%, immunologisch konnten mit über 24 monospezifischen Antiseren gegen Humanplasmaeigenschaften des α_1 -, α_2 - und anodischen β -Bereichs nur α_1 -Antichymotrypsin und/oder Gc-Globulin nachgewiesen werden.

α_1 -Foetoprotein wurde aus dem Tumorgewebe nach LEHMANN und LEHMANN (6) durch einen Hitzeschritt, Calciumphosphatgelsorption, fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, DEAE-A 50-Sephadex-Chromatographie, Gelfiltration über Sephadex-G 100 und Immunabsorption durch lösliche IgG-Frakturen präpariert. Die Reinheit in der Polyacrylamidgelelektrophorese betrug über 99%, immunologisch konnte mit 24 Antiseren gegen Humanplasmaeigenschaften des α_1 -, α_2 - und anodischen β -Bereichs nur Gc-Globulin nachgewiesen werden.

Antiseren

Antiseren wurden durch Immunisierung von Bastardkaninchen mit reinem α_1 -Foetoprotein in komplettem FREUND'schen Adjuvans nach dem in l. c. (5) und (8) angegebenen Schema gewonnen. In Doppeldiffusion, Immunelektrophorese und Absorptionsversuchen wurden pro Kaninchen in den Antiseren zwischen einem und fünf unspezifische Antikörper gefunden; mit monospezifischen Anti-Humanplasmaeigenschaften konnten drei Antikörper als Antikörper gegen α_1 -Antichymotrypsin, Coeruloplasmin und Gc-Globulin identifiziert werden. Zwei weitere fakultative Antikörper waren wahrscheinlich gegen α_1 -B-Glycoprotein und α_2 -Antithrombin III gerichtet.

Die Absorption der Antiseren erfolgte schrittweise durch Zugabe einer mit Glutaraldehyd quervernetzten Serumfraktion als Immunoabsorbens; Normalserum wurde mit Ammoniumsulfat auf 45% Sättigung gebracht, der 20000 g-Überstand durch Dialyse entsalzt und in phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung, pH 7,2, überführt und nach TERNYNK und AVRAMEAS (9) bei

einer Proteinkonzentration von 50 g/l bei pH 5,0 mit Glutaraldehyd polymerisiert. Verbleibende Antikörper gegen Spureneigenschaften wurden gegebenenfalls mit reinen (oder angereicherten Fraktionen von) α_1 -Antichymotrypsin, Gc-Globulin und Coeruloplasmin voll absorbiert. Nach der Absorption zeigten die Antiseren in Verdünnungsreihen gegen normale und pathologische Seren, gegen Extrakte und/oder angereicherte Fraktionen aus normaler menschlicher Leber sowie gegen Homogenat von primären Leberzellkarzinomen keine unspezifischen Präzipitate. Die Titerhöhe der gepoolten absorbierten Antiseren betrug 0,5–3 g α_1 -Foetoprotein/l.

Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG wurde für die passive Hämagglutination wie folgt hergestellt: Gepoolte und absorbierte Antiseren wurden mit Ammoniumsulfat bis 40% gesättigt, der Niederschlag des 20000 g-Präzipitates wurde in 0,2 mol/l Phosphatpuffer nach Sørensen mit 1 mmol/l EDTA, pH 7,5, aufgenommen und gegen 0,01 mol/l Phosphatpuffer nach Sørensen mit 50 μ mol/l EDTA, pH 7,5 ammoniumsulfatfrei dialysiert, auf eine DEAE-Cellulose-säule, Typ SS-50, (h = 40 cm, ϕ = 2,7 cm) aufgetragen und mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer nach Sørensen mit 50 μ mol/l EDTA, pH 7,5, eluiert. Der erste beim Waschen eluierte Gipfel wurde in 40proz. Ammoniumsulfat aufgenommen und gegen 0,2 mol/l Phosphatpuffer nach Sørensen mit 1 mmol/l EDTA, pH 7,5 dialysiert. Die Titerhöhe betrug etwa 0,6 g α_1 -Foetoprotein/g IgG. Die immunologische Reinheitsprüfung mit Anti-Kaninchen-Serum vom Esel, Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum sowie Anti-Kaninchen-IgG-, -IgA- und -IgM-Serum von der Ziege zeigte in der Immunelektrophorese ein reines IgG-Präparat.

Reagenzien

Anti-Human-Plasmaeigenschaften, Anti-Kaninchen-Serum und Anti-Kaninchen- γ -Globulin-Serum wurden von den Behringwerken, Marburg, Anti-Kaninchen-IgG, Anti-Kaninchen-IgA und Anti-Kaninchen-IgM-Serum von Miles-Servac, Lausanne, bezogen. DEAE-Cellulose erhielten wir von Serva, Heidelberg, DEAE-A 50-Sephadex und Sephadex-G 100 von Pharmacia, Frankfurt, sämtliche Chemikalien von Merck, Darmstadt (mit Ausnahme von Triäthanolamin und Polyvinylpyrrolidon, welches von Fluka, Buchs, Schweiz, bezogen wurde), Agar-Noble von Difco Laboratories, Detroit oder Behring, Marburg, Agarose von Behring, Marburg und komplettes FREUND'sches Adjuvans von Biological Laboratories, Baltimore.

Methoden und methodische Ergebnisse

1. Biochemische Methoden

Eiweiß wurde mit dem Biuret-Reagenz, die Ammoniumsulfat-Molarität mit NESSLER's-Reagens nach BEISENHERZ et al. (10) bestimmt. Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde als Flachdiskelektrophorese, System Desaga, Heidelberg, mit dem Puffersystem nach ALLEN der Fa. Ortec, Oak Ridge, nach ALLEN, MOORE und DILWORTH (11) von Herrn Dr. R. QUAST (Hygiene Institut der Universität Marburg) in 4proz., 6proz. und 8proz. Polyacrylamidgel durchgeführt; die Färbung erfolgte mit 0,25proz. Coomassie-Brillantblau (Serva, Heidelberg), die Auswertung mit dem Vitatron-UV-Densitometer. Die Polymerisierung von Ammoniumsulfatfraktionen aus Normalplasma wurde bei pH 5,0 nach TERNYNK und AVRAMEAS (9) mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 50 g/l durchgeführt, die Quervernetzung von IgG-Präparationen erfolgte bei pH 7,0 bei einer Konzentration von 50 g/l nach demselben Verfahren. Die Immunelektrophorese erfolgte nach GRABAR und WILLIAMS (12) in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER (13) in 0,066 mol/l Na-Barbitalpuffer, pH 8,6.

2. Doppeldiffusion (Mikrotechnik) nach OUCHTERLONY (14) im LKB-System in 1proz. Agar in 0,2 mol/l Phosphatpuffer mit 1 mmol/l EDTA, pH 7,5; Lochgröße: 10 μ l; Lochabstand: 10 mm, Diffusionszeit: 24 h.

3. Doppeldiffusion (Makrotechnik) nach OUCHTERLONY (14) im Desaga-System in 1proz. Agar in 0,2 mol/l Phosphatpuffer

mit 1 mmol/l EDTA, pH 7,5. Lochgröße: 75 μ l; Lochabstand: 13 mm; Diffusionszeit: 48 h.

4. Überwanderungselektrophorese (Elektroimmunoosmophorese) auf Objektträgern im LKB-System nach KRASSNITZKI, PESENDORFER und WEWALKA (15) in 0,75proz. Agar-Agarosegemisch (1:1) in 0,022 mol/l Na-Barbitalpuffer, pH 8,6. Lochgröße: 10 μ l; Lochabstand: 20 mm; Stromstärke: 50 mA; Elektrophoresedauer: 45 min; Elektrophoresepuffer: 0,066 mol/l Na-Barbitalpuffer, pH 8,6.

Methodische Bemerkungen

Bei hoher α_1 -Foetoproteinkonzentration im Serum (> 2 mg/ml) kann bei längerer Elektrophoresedauer, insbesondere bei niedrigem Antikörpertiter im Antiserum, wegen Antigenüberschusses infolge „Durchwanderns“ des Antigen-Antikörper-Komplexes ein falsch-negatives Resultat erhalten werden. Niedrigtiterige Antiseren eignen sich in der Überwanderungselektrophorese zur Steigerung der Empfindlichkeit, da die höchste Sensibilität im Antigen-Antikörper-Äquivalenzbereich bei eben sichtbaren Präzipitaten erreicht wird. Um diese falsch-negativen Ergebnisse zu vermeiden, ist stets ein zweiter Ansatz mit verdünntem Patientenserum oder mit einem hochtitrigen Antiserum bzw. IgG-Präparat erforderlich.

5. Latex-Agglutination: Latex-Polystyrol-Partikel wurden chemisch kovalent mit einer spezifischen Anti- α_1 -Foetoprotein- γ -Globulin-Fraktion beladen; das Reagenz wurde uns freundlicherweise von Dr. L. BONACKER und Dr. S. BAUDNER, Behringwerke, Marburg, zur Verfügung gestellt. Bei der Durchführung des Schnelltestes werden 30 μ l des zu untersuchenden Serums und 30 μ l Latex-Reagenz mit einer Hamilton-Spritze auf eine schwarz beschichtete Glas- oder Kunststoffplatte gegeben und nach sanftem Schütteln nach 3 min makroskopisch im Schräglicht abgelesen.

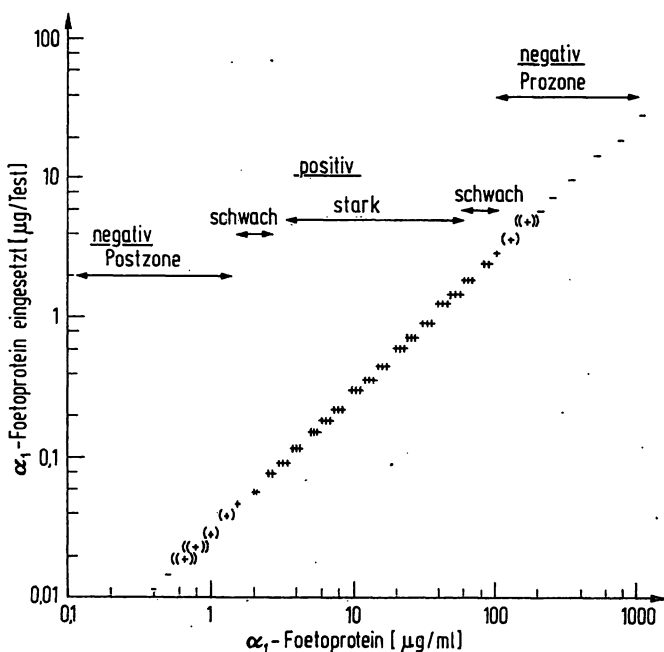


Abb. 1

Latex-Agglutination: Titrierung des Latex-Reagenz mit kristallinem α_1 -Foetoprotein (entsalzt) in 0,9proz. physiologischer NaCl-Lösung. Ausgeprägter Prozoneneffekt, optimale Reaktionsbedingungen zwischen 0,1 mg/ml und 0,0016 mg/ml bzw. 3 μ g und 48 ng α_1 -Foetoprotein (doppeltlogarithmische Darstellung)

Methodische Bemerkungen

Optimale Reaktionsbedingungen herrschen nur im Antigen-Antikörper-Äquivalenzbereich (s. Abb. 1). Es besteht ein ausgeprägter Prozoneneffekt bis zu einer Konzentration von 100 mg/l. Zur Vermeidung falsch-negativer Resultate bei hohen α_1 -Foetoproteinkonzentrationen im Serum ist neben dem Ansatz mit unverdünntem Serum stets eine 1:20- und/oder 1:50-Verdünnung des zu untersuchenden Serums anzusetzen. Bei Vorkommen von Anti-Human- γ -Globulin im Patientenserum (sog. Rheumafaktor) tritt stets, bei Gabe bestimmter Medikamente (16) und bei einigen Autoimmunerkrankungen häufig eine unspezifische Spontanagglutination der Latex-Partikel ein; falsch-positive Ergebnisse sind daher relativ häufig. Aus diesem Grunde muß bei jeder Latex-Agglutination auf α_1 -Foetoprotein gleichzeitig eine Latex-Agglutination mit einem Latex-RF-Reagenz zum Nachweis des Rheumafaktors und zum Ausschluß einer Spontanagglutination der Latex-Partikel durchgeführt werden.

6. Passive Hämagglutination

Die passive Hämagglutination wurde nach KABAT und MAYER (17) mit den Modifikationen von RAJEWSKI, ROTTLÄNDER, PELTRE und MÜLLER (18) und PFLEIDERER, LINKE und REINHARDT (19) ausgeführt. Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG wurde mit bis-diazotiertem Benzidin auf frische, gewaschene unstabilisierte Hammelerythrocyten gebunden. Die Antikörperkonzentration bei der Kupplung betrug 0,2 mg Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG/ml. Die Ausführung des Testes erfolgte mit der Mikrotiter-Ausrüstung der Fa. Cooke, Alexandria (USA), die wir von den Flow-Laboratories, Irvine, Schottland, bezogen.

Durchführung

a) Vorbereitung der Seren

Hämolysereies Serum wird 30 min bei 56°C inaktiviert. Das dekomplementierte Serum wird 60 min bei 37°C im Verhältnis 5:1 mit einer 10proz. Hammelerythrocytensuspension absorbiert; frische unstabilisierte Hammelerythrocyten werden vor dem Einsatz zur Absorption mindestens dreimal in phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, gewaschen. Nach Beendigung der Absorption wird bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand geometrisch im Mikrotiterverfahren mit Polyvinylpyrrolidon in phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, verdünnt (K 30 pharm. purum, MG etwa 40000, 3,5 g/l).

b) Kupplung der Antikörper

Es werden 10 min bei 37°C inkubiert: 1,0 ml reines Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG in phosphatgepufferter NaCl-Lösung pH 7,2, 2 g/l; 4,5 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung pH 7,2; 4,0 ml 10proz. frische dreimal in phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, gewaschene Hammelerythrocytensuspension; 0,5 ml frische Benzidinlösung, 1:10 verdünnt (460 mg Benzidin, gelöst in 97 ml H₂O und 3 ml 6 mol/l HCl, Zugabe von 350 mg NaNO₂, Rühren bei 4°C bis durch Jodstärkepapier kein positiver Nachweis im Überstand zu führen ist). Nach dem Abzentrifugieren bei 3000 g werden die mit Antikörper beladenen Erythrocyten dreimal in phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, gewaschen, in 10 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, aufgenommen und unmittelbar in den Test eingesetzt.

c) Agglutination

Je 50 μ l antikörperbeladene Hammelerythrocytensuspension und geometrisch verdünntes Patientenserum werden in die Mikrotiterplatten eingetragen. Nach 45 min Inkubation bei 37°C wird abgelesen. Folgende Kontrollen werden bei jedem Versuch mitge-

führt: Kristallines α_1 -Foetoprotein, physiologische NaCl-Lösung, positives Patientenserum, negatives Patientenserum, gewaschene Erythrocyten ohne Antikörper (bei der Kupplung auf die Erythrocyten wird entweder kein Benzidin oder kein Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG eingesetzt).

Methodische Bemerkungen

1. Die Reproduzierbarkeit in Doppelbestimmungen im selben Versuchsansatz ist gut; Doppelbestimmungen an verschiedenen Tagen zeigen auch bei Einsatz derselben Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG-Präparation infolge unterschiedlichen Erythrocytenalters bzw. verschiedener Erythrocytenchargen nur eine bedingte Vergleichbarkeit mit Unterschieden bis zu drei, maximal vier Titerstufen. Durch Mitführen eines kristallinen α_1 -Foetoproteinstandards bzw. eines geeichten Sekundärstandards läßt sich jedoch eine Angleichung der Titerstufen vornehmen.
2. Bei hohen α_1 -Foetoproteinkonzentrationen im Serum besteht ein ausgeprägter Prozoneneffekt (Abb. 2); zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse sind daher die Verdünnungen immer bis zu einer Titerstufe von 1:64 bzw. 1:128 durchzuführen.
3. Es besteht eine gute doppelt-logarithmische Korrelation von $r = 0,81$ zwischen der semiquantitativen Bestimmung in der passiven Hämagglutination und der quantitativen Bestimmung in der radialen Immunodiffusion (Abb. 3).
4. Entscheidend für die Sensibilität des Testsystems und die störungsfreie Reproduzierbarkeit der Bestimmung ist die Monospezifität und Menge der Antikörper, die auf die Erythrocyten gebunden werden. Durch die Isolierung der IgG-Fraktion aus hochtitrigen

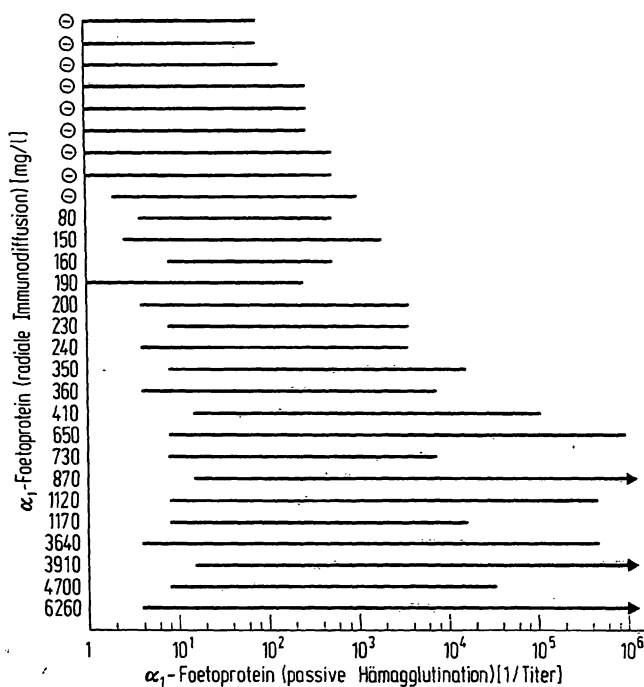


Abb. 2

Passive Hämagglutination: Prozoneneffekt in 28 aufeinanderfolgenden Seren von Patienten mit primären Leberzellkarzinomen, geordnet nach der α_1 -Foetoproteinkonzentration in der radialen Immunodiffusion. \ominus = wegen zu niedriger Konzentration in der radialen Immunodiffusion nicht meßbar

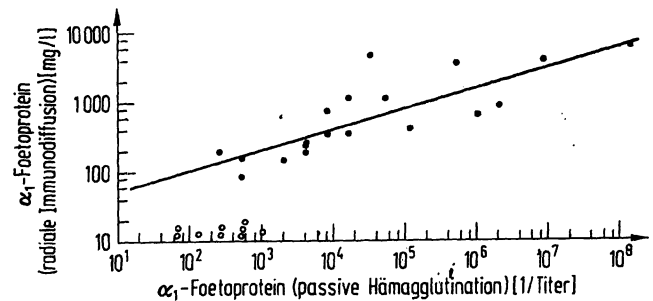


Abb. 3

Doppeltlogarithmische Korrelation des reziproken Titers in der passiven Hämagglutination zur Konzentration in der radialen Immunodiffusion in 28 aufeinanderfolgenden Seren von Patienten mit primären Leberzellkarzinomen. $r = 0,81$ bei $n = 19$ (●); 9 Seren (○) hatten bei positiven Titern in der passiven Hämagglutination von 1:64 bis 1:1024 keine Präzipitatre in der linearen Bereich der radialen Immunodiffusion, sie sind in der Korrelation nicht berücksichtigt

praktisch reinen IgG-Antisera (wie sie durch unsere Immunisierungsverfahren (5, 8) hergestellt werden können) gelingt eine Anreicherung der spezifischen Antikörperkonzentration und Stabilisierung des Testsystems. Alle von uns untersuchten kommerziell erhältlichen Antisera waren für diese Untersuchungstechnik infolge zu niedriger Antikörperkonzentration unbrauchbar. Die optimale IgG-Konzentration bei der Kupplung mit bis-diazotiertem Benzidin auf die Erythrocytenoberfläche beträgt 2 g/l; der Anteil der mit α_1 -Foetoprotein präzipitierenden IgG-Proteine sollte $\geq 60\%$ der IgG-Fraktion betragen. Bei niedrigerer IgG-Konzentration ist die auf die Erythrocytenoberfläche gebundene Antikörpermenge zu gering, bei höheren Konzentrationen die Hämolyse der Erythrocyten und der Antikörperverlust zu groß. Das Testsystem darf nicht, wie für andere Antigen-Antikörper-Reaktionen empfohlen, mit Humanalbumin stabilisiert werden, da Endkonzentrationen zwischen 0,005 und 5 g/l Humanalbumin unwirksam sind und/oder zur Spontanhämolyse der Erythrocyten führen. Die besten Ergebnisse erhält man bei Verwendung der Hammelerythrocyten in den ersten 3 Tagen nach der Blutentnahme.

5. Anti-Human- γ -Globulinpositive Seren führen erst bei WAALER-ROSE-Titern über 1:64 bis 1:128 zu schwacher Agglutination bzw. Conglutination der Erythrocyten; daß anti-Human- γ -Globulinhaltige Seren bei niedrigen Titern nicht und bei höheren Titern nur sehr gering zur Agglutination führen, könnte möglicherweise auf die ausgiebige Absorption der Seren mit Hammelerythrocyten zurückzuführen sein, wodurch die mit Schaf- γ -Globulin kreuzreagierenden Antikörper vollabsorbiert werden können.

6. Der entscheidende Vorteil der passiven Hämagglutination im umgekehrten Verfahren (mit Bindung von Antikörpern auf die Erythrocytenoberfläche) gegenüber dem passiven Hämagglutinations-Hemmtest liegt in der sehr niedrigen Menge reinen α_1 -Foetoproteins, die zur Standardtitration benötigt wird; im passiven Hämagglutinations-Hemmtest sind demgegenüber große Mengen reinen Tumorantigens zur Erythrocytenkupplung erforderlich.

Tab. 1

Empfindlichkeit verschiedener immunologischer Methoden bei Titration mit kristallinem α_1 -Foetoprotein (Einzelheiten: siehe unter Methodik)

Methode	Einsatz/Test (μ l)	Nachweisbare Menge α_1 -Foetoprotein (μ g)	Nachweisbare Konzentration α_1 -Foetoprotein (mg/l)	
			deutlich positiv	schwach positiv
<i>Qualitativ</i>				
Mikro-Ouchterlony	10	0,17	16,7	10,0
Makro-Ouchterlony	75	0,53	7,1	5,2
Überwanderungselektrophorese	15	0,07	4,5	3,6
<i>Semi-Quantitativ</i>				
Latex-Agglutination ¹⁾	30	0,10	3,3	1,4
Passive Hämagglutination ²⁾	25	0,0004	0,030	0,015
<i>Quantitativ</i>				
Elektro-Immunodiffusion	3	0,03	etwa 3	
Radiale Immunodiffusion	5	0,10	etwa 10	

¹⁾ Prozoneneffekt bis 100 mg/l²⁾ Prozoneneffekt bis 200 mg/l

Tab. 2

Häufigkeit positiver Ergebnisse bei primären Leberzellkarzinomen (unselektioniertes Krankengut, bei dem vor Durchführung der immunologischen Untersuchungen die Diagnose histologisch und/oder laparoskopisch gesichert worden war)

Methode	n	α_1 -Foetoprotein			% positiv
		positiv	nicht verwertbar	negativ	
Mikro-Ouchterlony	26	15	—	11	57,7
Latex-Agglutination	26	18	4	4	69,3
Überwanderungselektrophorese	26	21	—	5	80,8
Passive Hämagglutination	26	26	—	—	100,0

7. Elektroimmunodiffusion

nach LAURELL (21) auf 7×7 cm großen umrandeten Plastikplatten in 0,9proz. Agarose in 0,022 mol/l Na-Barbitalpuffer, pH 8,6; Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG-Konzentration: 1,7% (0,2 ml Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG werden bei 45°C mit 11,8 ml Agarose wie oben angegeben je Platte vermischt); Lochgröße: 3 μ l, 12 Löcher/Platte (in zwei Reihen); Elektrophoresepuffer: 0,066 mol/l Na-Barbitalpuffer, pH 8,6; Elektrophoresedauer 90 min bei 100 V und 50 mA. Für jeden Versuchsansatz wird kristallines Antigen in Verdünnungsreihen für eine Eichkurve mitgeführt (Abb. 4); Linearität besteht bei Konzentrationen von 17 mg/l bis 250 mg/l.

8. Radiale Immunodiffusion

nach MANCINI (21) in 1,8proz. Agarose in 0,066 mol/l Na-Veronal-Puffer, pH 8,4; Antiserumkonzentration 5%—8% in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration; Gesamtvolumen/Platte: 5,5 ml in Partigen-Schalen der Behringwerke, Marburg/Lahn; Lochgröße: 5 μ l, 12 Ansätze/Platte; Diffusionszeit: 48 h (bei Kreisdurchmesser > 8 mm: 72 h). Die erhaltenen Werte werden an einer Eichkurve (Abb. 4) abgelesen, die mit kristallinem α_1 -Foetoprotein erhalten wurde; Linearität besteht bei Konzentrationen von 66 mg/l bis 420 mg/l.

9. Vergleich der Methoden

Die untere Nachweiskonzentration für α_1 -Foetoprotein in verschiedenen immunologischen Methoden wurde für die Doppeldiffusion (Mikro- und Makro-Technik), die Überwanderungselektrophorese, die Latex-Agglutination, die passive Hämagglutination, die Elektroimmunodiffusion und die radiale Immunodiffusion durch Titrierung mit kristallinem Antigen wie folgt ermittelt: Reines α_1 -Foetoprotein wurde aus einer 1 mg/ml durch Dialyse entsalzten Tumorantigenlösung arithmetisch mit 0,9proz. Na-Cl verdünnt. Die Proben jeder einzelnen

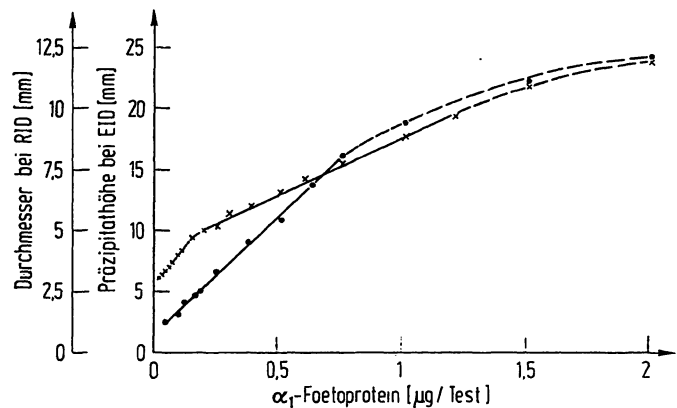


Abb. 4

Eichkurven für die Elektroimmunodiffusion (EID \bullet — \bullet) und die radiale Immunodiffusion (RID \times — \times) bei Titrierung mit kristallinem α_1 -Foetoprotein aus Plasma (Elektroimmunodiffusion) bzw. Tumorgewebe (radiale Immunodiffusion) von Patienten mit primären Leberzellkarzinomen. Linearität für die Elektroimmunodiffusion von 17 mg/l bis 250 mg/l, für die radiale Immunodiffusion von 66 mg/l bis 420 mg/l (durchgezogene Linien). Einzelheiten: siehe unter Methodik

Verdünnungsreihe wurden von einem Untersucher zufallsbedingt untereinander vertauscht, protokolliert und zum Test eingesetzt, so daß jeder einzelne Versuch eine andere „bunte Reihe“ unterschiedlicher Tumorantigenkonzentrationen in verschiedener Aufeinanderfolge enthielt. Ein zweiter Untersucher, dem die eingesetzten Konzentrationen unbekannt waren, nahm die Ablesung der immunologischen Ergebnisse vor, die in allen Präzipitationstechniken in ungefärbten Platten erfolgte. Als positiv bewertet wurden die eindeutig sichtbaren Präzipitate der „bunten Reihe“, alle fraglichen Antigen-Antikörper-Präzipitatlinien wurden als

negativ bewertet. Danach wurden die Ergebnisse entschlüsselt und in Tabelle 1 zusammengetragen. Alle Untersuchungen wurden in Dreifach- bis Fünffach-Bestimmungen durchgeführt. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, wird die Empfindlichkeit gegenüber der Mikro-OUCHTERLONY-Technik in der Makro-Methode um den Faktor 2, in der Überwanderungselektrophorese um den Faktor 3, in der Latex-Agglutination um den Faktor 6 und in der passiven Hämagglutination um den Faktor 100 gesteigert, wenn Titer von 1:4 und höher als positive Ergebnisse bewertet werden. Falsch-negative Ergebnisse finden sich in unverdünnten Präparaten bei α_1 -Foetoproteinkonzentrationen über 2 mg/ml, in der Überwanderungselektrophorese durch Überwanderung des Antigen-Antikörper-Komplexes, in der Latex-Agglutination und in der passiven Hämagglutination bei Konzentrationen über 100 bzw. 200 mg/l infolge des Prozoneneffektes.

Klinische Ergebnisse

Bei 26 unausgewählten Patienten mit histologisch, laparoskopisch und/oder autopsisch gesichertem primärem Leberzellkarzinom²⁾ fanden wir in der ersten Serumprobe nach der Klinikeinweisung in der Mikro-OUCHTERLONY-Technik in 57,7%, in der Latex-Agglutination in 69,3%, in der Überwanderungselektrophorese (Elektroimmunodiffusion) in 80,8% und in der passiven Hämagglutination in allen Seren positive Ergebnisse (Tab. 2). In der Doppeldiffusion wurden nur eindeutig erkennbare Antigen-Antikörperpräzipitate in ungefärbten Platten als positiv bewertet; eine Deviation der Antigen-Antikörper-Präzipitatlinie des Referenzsystems im Überkreuzansatz mit dem getesteten Serum wurde in zwei Seren gefunden und in der Rubrik „negativ“ eingetragen. Unter Berücksichtigung dieser Seren steigt der Anteil positiver Ergebnisse in der Doppeldiffusion auf 65,4%. In der Überwanderungselektrophorese wurden sämtliche Seren unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:20 bzw. 1:50 angesetzt und in ungefärbten Platten abgelesen. Im Latex-Test auf α_1 -Foetoprotein fanden wir in weiteren 4 Seren positive Ergebnisse, die jedoch wegen eines positiven Latex-Rh-Faktor-Testes (Anti-Human- γ -Globulin im Serum bzw. Spontanagglutination der Latexpartikel) nicht verwertbar waren. In der passiven Hämagglutination zeigten alle Seren Titer über 1:32; der höchste Titer betrug 1:8 · 10⁶.

Bei 25 dieser 26 Patienten wurde der α_1 -Foetoproteinspiegel im Serum semiquantitativ in der passiven Hämagglutination bzw. quantitativ in der radialen Immunodiffusion bestimmt (Abb. 5). Die α_1 -Foetoproteinkonzentration in der ersten Serumprobe nach der Klinikaufnahme betrug zwischen 1,6 mg/l und 4700 mg/l; bei weiteren 8 Patienten mit histologisch, laparoskopisch und/oder autopsisch gesichertem Leberzellkarzinom, die jedoch keinem unausgewählten

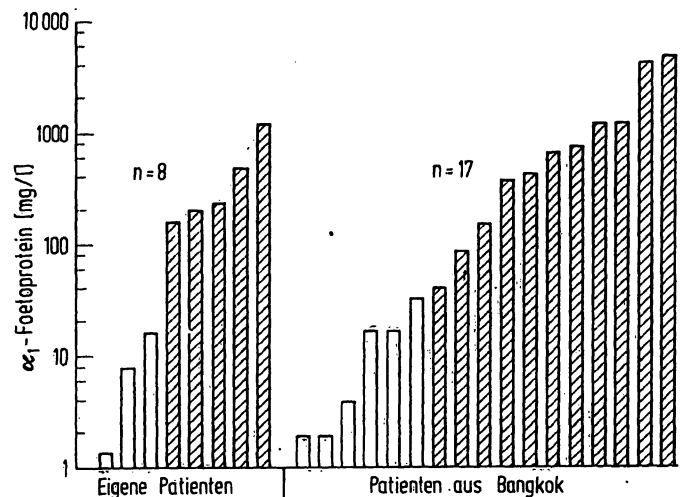


Abb. 5

α_1 -Foetoproteinkonzentration im Serum bei 25 unausgewählten Patienten mit primärem Leberzellkarzinom (erste Bestimmung nach Klinikeinweisung). In 9 Seren, in denen der α_1 -Foetoproteinspiegel für die Messung in der radialen Immunodiffusion (●●) zu niedrig war, wurde die Tumorantigenkonzentration semiquantitativ in der passiven Hämagglutination (●●) im direkten Vergleich mit einem reinen α_1 -Foetoproteinstandard bestimmt (logarithmische Ordinate)

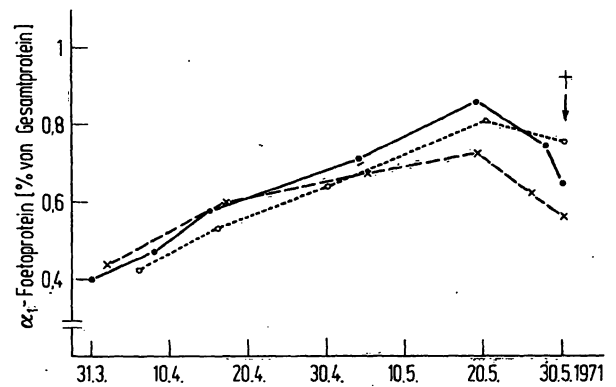


Abb. 6

α_1 -Foetoproteinkonzentration im Serum (●—●), Ascites (×—×) und Pleurapunktat (○---○) bei einer 60-jährigen Patientin mit primärem Leberzellkarzinom (radiale Immunodiffusion). Tumorgewicht 2620 g

Krankengut entstammen, wurden Serumkonzentrationen bis zu 6260 mg/l gefunden. In der Regel kommt es zu einem langsam progredienten Tumorantigenanstieg im Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten, wie Ascites und Pleurapunktat (Abb. 6), der häufig von einem — bisher ungeklärten — präterminalen Abfall der Tumorantigenkonzentration gefolgt wird. In unserem Beispiel ist dieser Konzentrationsabfall teilweise auf eine Oesophagusvarizenblutung zurückzuführen, die zu einer erheblichen „Verdünnung“ des Tumorantigens im Serum durch Plasmaverlust geführt hat, die durch Umrechnung auf Gesamteiweiß infolge von Transfusionen und Humanalbuminfusionen nicht ganz ausgeglichen werden kann.

Bei insgesamt 380 unausgewählten Patienten mit anderen Karzinomen oder Lebererkrankungen wurden in der Mikro-OUCHTERLONY-Technik und in der Überwanderungselektrophorese unter 142 Patienten mit anderen malignen Tumoren (mit Ausnahme von primärem Leberzellkarzinomen und Teratoblasto-

²⁾ 17 Seren verdanken wir Dr. UKRIST Plengvanit, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

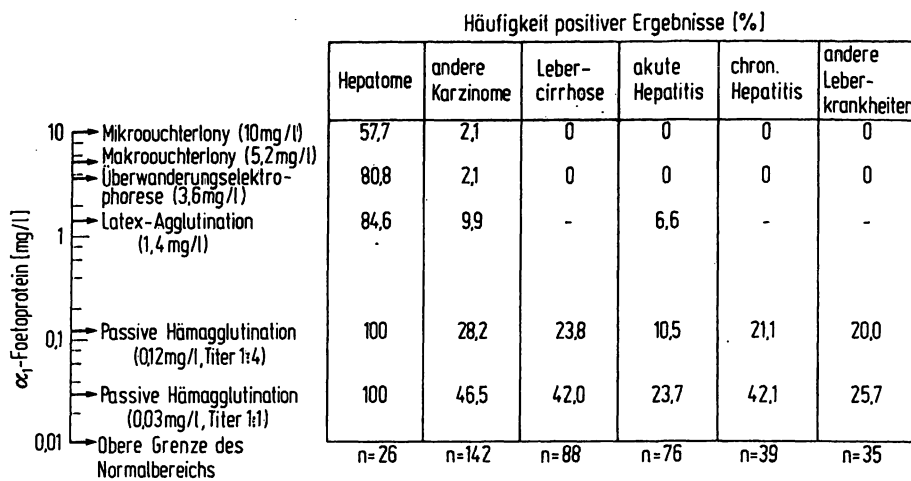


Abb. 7

Häufigkeit positiver Testergebnisse in der Mikro-OUCHTERLONY-Technik, der Überwanderungselektrophorese, der Latex-Agglutination und der passiven Hämagglutination (Titer $\geq 1:4$ und Titer $\geq 1:1$) unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit der Methode bei Titration mit reinem α_1 -Foetoprotein (Ordinate, logarithmischer Maßstab) bei 26 Patienten mit primärem Leberzellkarzinom, 142 Patienten mit anderen Karzinomen (mit und ohne Lebermetastasen), 88 Patienten mit Leberzirrhose, 76 Patienten mit akuter Virushepatitis (Typ A und Typ B), 39 Patienten mit chronischer Hepatitis (chron. aggressive und chron. persistierende Hepatitis) und 35 Patienten mit anderen benignen Lebererkrankungen

men) in 2,1% der Fälle positive Ergebnisse gefunden; es handelte sich dabei um ein jeweils entdifferenziertes Magenkarzinom, Bronchialkarzinom und vom Retroperitoneum ausgehendes, histologisch nicht eindeutig zu klassifizierendes Malignom mit Lebermetastasen. In der Latex-Agglutination fanden wir bei Karzinomen in 9,9% und unter 76 Patienten mit akuter Virushepatitis in 6,6% positive Ergebnisse. In der passiven Hämagglutination fanden sich Titer von 1:4 und höher in 28,2% der Patienten mit malignen Tumoren, in 23,8% bei 80 Patienten mit Leberzirrhose, in 10,5% bei 76 Patienten mit akuter Virushepatitis, in 21,1% bei 39 Patienten mit chronisch aggressiver und chronisch persistierender Hepatitis und in 20,0% bei 35 Patienten mit anderen Lebererkrankungen (Alkohol-Hepatitis, Hämochromatose, primär biliäre Zirrhose, Fettleber, u. a.). Titer von 1:1 (unverdünntes Serum) und höher fanden wir in 46,5% bei Karzinomen, in 42,0% bei Leberzirrhose, in 23,7% bei akuter Virushepatitis, in 42,1% bei chronischer Hepatitis und in 25,7% bei anderen Lebererkrankungen. Der Prozentsatz positiver Ergebnisse ist ausschließlich von der Empfindlichkeit der Technik abhängig (Abb. 7); mit zunehmender Sensibilität nimmt der Anteil „falsch“-positiver Resultate zu.

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Immunisierung mit kristallinem Tumorantigen zu hochtrügigen und monospezifischen Antiseren führt, die die Entwicklung empfindlicherer immunologischer Techniken erlauben. Mit der Steigerung der Sensibilität erhöht sich die Zahl positiver Resultate, insbesondere beim primären Leberzellkarzinom. Im Routinelaboratorium sollte der *qualitative Nachweis* von α_1 -Foetoprotein durch *Präzipitationstechniken* wie der Mikro-OUCHTERLONY-Technik und/oder der Elektroimmunoosmopherese erfolgen. In der Doppeldiffusion können etwa 60%, in der Überwanderungselektrophorese etwa 80% der primären Leberzellkarzinome diagnostiziert werden. Die Anzahl positiver Ergebnisse bei Teratoblastom bei Patienten über 15 Jahren dürfte in der Mikro-OUCHTERLONY-Technik bei etwa 20% liegen (22, 23, 24).

„Falsch“-positive Ergebnisse sind bei anderen Karzinomen, insbesondere bei Lebermetastasierung, in etwa 2% in der Doppeldiffusion und in der Überwanderungselektrophorese zu erwarten. Wenn man alle bisher publizierten Ergebnisse in der Doppeldiffusion bei anderen Karzinomen (22 verschiedene Arbeitsgruppen mit über 1000 Karzinompatienten) zusammenfaßt, liegt die Häufigkeit „falsch“-positiver Ergebnisse mit dieser Methode bei Karzinompatienten deutlich unter 1%. Die häufigere Trefferquote von 2,1% in unserem Material dürfte auf eine systematische Suche und bessere Antiseren zurückzuführen sein und den wahren Verhältnissen näher kommen. Insgesamt wurde bisher über 14 Magenkarzinome, 4 Bronchialkarzinome, sowie Einzelfälle von Colon-, Pankreas- und Prostatakarzinomen mit positiver Doppeldiffusion jeweils in Einzelbeobachtungen berichtet (Übersichten bei l. c. 1, 2); unsere drei Fälle sind hierbei nicht berücksichtigt. Bei über 70% dieser Patienten wurden Lebermetastasen gesichert; wahrscheinlich liegt der Anteil sekundärer Leberkarzinome noch höher, da einige Patienten nicht seziiert wurden und somit eine Lebermetastasierung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen ist. Bei benignen Lebererkrankungen fanden wir keine „falsch“-positiven Ergebnisse mit diesen beiden Methoden. Wenn man von geringen transitorischen, wenige Tage anhaltenden Anstiegen des α_1 -Foetoproteins bei jungen Patienten mit akuter Virushepatitis absieht, ist bei benignen Lebererkrankungen mit relativ unempfindlichen Techniken, wie den Präzipitationsmethoden, nicht mit positiven Ergebnissen zu rechnen. Aus einer Sammelstatistik aus 8 Arbeitsgruppen mit über 2200 Patienten mit verschiedenen benignen Lebererkrankungen läßt sich eine Häufigkeit „falsch“-positiver Ergebnisse (unter Einschluß der Patienten mit akuter Virushepatitis) weit unter 0,5% der untersuchten Seren errechnen (1). Unter den wenigen, bisher vorliegenden Einzelbeobachtungen mit positiven Ergebnissen in der Doppeldiffusion bei akuter Virushepatitis scheinen junge Patienten unter 20 Jahren häufiger betroffen zu sein und die Präzipitate vorwiegend in der Regenerationsphase zwischen dem 10. und 15. Tag nach dem Maximum des Transaminasenanstiegs aufzutreten. Bei

der Suche nach primären Leberzellkarzinomen, insbesondere beim „screening“ von Patienten mit Leberzirrhose ist somit ein positives Ergebnis in der Überwanderungselektrophorese und/oder der Mikro-OUCHTERLONY-Technik quasi pathognomonisch für ein primäres Leberzellkarzinom. Ein negatives Resultat kann diese Diagnose jedoch niemals ausschließen, da etwa 20% bis 40% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung einen so niedrigen α_1 -Foetoproteinspiegel im Serum haben, daß er mit diesen relativ unempfindlichen Methoden nicht erfaßt werden kann.

Die Latex-Agglutination eignet sich als *Schnelltest* bei guter Empfindlichkeit; da falsche Ergebnisse sehr häufig bei Rheumafaktor-positiven Patienten und gelegentlich bei Spontanagglutination der Latexpartikel bei Zugabe von Patientenserum gesehen werden, ist diese Methode nur in Verbindung mit einem positiven Nachweis in der Präzipitationstechnik beweiskräftig. Zweckmäßigerweise sollten daher alle Seren, die im Latex-Agglutinationstest unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1:20 oder 1:50 ein positives Ergebnis zeigen, in einer Präzipitationstechnik kontrolliert werden, bevor man das Ergebnis klinisch bewertet. Negative Latex-Agglutinationsteste bei Patienten mit primärem Leberzellkarzinom mit positiven Ergebnissen in der Präzipitationsmethode haben wir nie gesehen; ein negativer Schnelltest erlaubt daher sofort eine definitive klinische Aussage. Problematisch bleibt die Einordnung der in der Latex-Agglutination (bei negativem Latex-Rh-Test) positiven, in den Präzipitationstechniken jedoch negativen Fälle; hier kann α_1 -Foetoprotein mit Sicherheit nur durch Kontrolle durch den Konzentrationsanstieg bei malignen Tumoren nachgewiesen werden.

Die *passive Hämagglutination* eignet sich trotz großer Empfindlichkeit und guter Reproduzierbarkeit weniger als Routinemethode. Einerseits ist die Herstellung hochtitriger Anti- α_1 -Foetoprotein-IgG-Präparate nur aus den besten IgG-Antiseren möglich, wie man sie z. B. durch unsere Immunisierungsschemata mit kristallinem Antigen unter optimalen Verhältnissen erhält, andererseits ist eine absolute Monospezifität der IgG-Präparationen eine *conditio sine qua non*, wenn man ein spezifisches Testsystem aufbaut; die Absorption der Antiseren mit entsprechenden Immunabsorbentien aus Normalplasma, Leberfraktionen und reinen Plasma-proteinen ist nicht immer einfach, da die Verunreinigungen häufig in hoher Konzentration gegen Proteine gerichtet sind, die im Normalserum in niedrigen Konzentrationen vorkommen, wie α_1 -B-Glykoprotein, α_1 -Antichymotrypsin, u. a., und daher die Polymeren von Fall zu Fall in anderen Zusammenstellungen hergestellt werden müssen. Die Isolierung der kristallinen α_1 -Foetoproteine aus biologischem Material, wie Plasma, Tumorgewebe oder Ascites von Patienten mit primären Leberzellkarzinomen, die Immunisierung zur Herstellung der Antiseren und die Absorption der Immunseren zur Isolierung der IgG-Fraktion müssen jeweils vom Untersucher selbst vorgenommen werden,

da entsprechende kommerzielle Präparationen z. Zt. noch nicht erhältlich sind. Belastend ist darüber hinaus der relativ große Arbeitsaufwand und die Tatsache, daß diese Bestimmungen nur von immunologisch gut geschultem Personal durchgeführt werden können. In der passiven Hämagglutination schließt ein negatives Ergebnis ein primäres Leberzellkarzinom mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit aus, da histologisch oder autopsisch belegte Fälle von primären Leberzellkarzinomen mit negativem Ergebnis in der passiven Hämagglutination oder im Radioimmunoassay bisher nicht bekannt sind. Da andere Karzinome, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium entdifferenzierter Tumoren mit Lebermetastasierung, aber auch Leberzirrhosen, akute Virushepatitis, chronisch aggressive und chronisch persistierende Hepatitis, Alkoholhepatitis, primär biliäre Zirrhose, Hämochromatose und andere Lebererkrankungen relativ häufig zu positiven Befunden in niedrigen Titerverdünnungen führen, ist ein positives Ergebnis, insbesondere bei Titern zwischen 1:4 und 1:512 nicht beweisend. In den meisten Fällen ist jedoch durch kurzfristige Verlaufskontrollen eine Entscheidung möglich, ob eine benigne oder eine maligne Lebererkrankung vorliegt. In über 85% der Fälle normalisiert sich bei benignen Lebererkrankungen der pathologische Titer in der passiven Hämagglutination innerhalb von 8 Wochen. Bei primären Leberzellkarzinomen kommt es demgegenüber zu einem langsam progredienten Titeranstieg im Serum.

Quantitative Bestimmungen im Serum eignen sich zur Verlaufskontrolle, insbesondere unter zytostatischer, radiologischer oder operativer Therapie. Die radiale Immunodiffusion ist trotz des größeren Zeitaufwandes der Elektroimmunodiffusion wegen der besseren Reproduzierbarkeit, der problemlosen Durchführung und des wesentlich geringeren methodischen Aufwandes vorzuziehen, zumal antikörperhaltige Agarplatten kommerziell erhältlich sind. Die Elektroimmunodiffusion sollte nur in Konzentrationsbereichen unter 70 mg/l infolge ihrer größeren Empfindlichkeit angewendet werden. Nach Entfernung des Tumors sinkt der α_1 -Foetoproteinspiegel im Serum innerhalb weniger Tage auf Normalwerte ab, um bei Lokalrezidiven bzw. Metastasierung erneut anzusteigen; bei erfolgreicher Bestrahlung oder Chemotherapie kommt es nach einem häufig zu beobachtenden initialen Konzentrationsanstieg im Serum — der wahrscheinlich durch vermehrte Tumorantigenausschwemmung aus dem zerstörten Tumorgewebe zu erklären ist — zu einem deutlichen Rückgang der α_1 -Foetoproteinkonzentration im Serum, die mit der klinisch feststellbaren Tumorregression parallel geht. Erneuter Anstieg des Tumorantigenspiegels im Serum spricht auch hier für erneutes Tumorgewachstum.

Die vergleichenden immunologischen Untersuchungen für α_1 -Foetoprotein haben somit ergeben, daß eine Steigerung der Empfindlichkeit zu Lasten der Spezifität geht. Wünschenswert für Routineuntersuchungen wäre eine einfach durchführbare Methode, deren Grenz-

bereich bei etwa 0,1 bis 0,5 mg/l liegt. Möglicherweise läßt sich dies durch Konzentration des Serums vor dem Einsatz zu einer Bestimmung in einer Präzipitationstechnik in Verbindung mit einer besseren Sichtbarkeit

des Antigen-Antikörper-Präzipitates erreichen, wie es durch Färbung mit Coomassie-Blau, Fluoreszenzmarkierung oder radioaktive Markierung in der Autoradiographie möglich ist.

Literatur

1. LEHMANN, F.-G. (1972), *Internist* 13, 332—339. — 2. MASSEYEFF, R. (1972), *Pathol. Biol.* 20, 703—725. — 3. ALPERT, E., HERSHBERG, R., SCHUR, P. H. & ISSELBACHER, K. J. (1971), *Gastroenterology* 61, 137—143. — 4. ABELEV, G. I. (1970), *Coll. Prot. Biol. fluids* 18, 203—209. — 5. LEHMANN, F.-G., LEHMANN, D. & MARTINI, G. A. (1971), *Clin. Chim. Acta* 33, 197—206. — 6. LEHMANN, F.-G. & LEHMANN, D. (1971), *diese Z.* 9, 309—313. — 7. LEHMANN, F.-G. (1971), *Klin. Wochenschr.* 49, 609—611. — 8. LEHMANN, F.-G. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 235, 259—275. — 9. AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. (1969), *Immunochemistry* 6, 53—66. — 10. BEISENHERZ, G., BOLTZE, H. J., BÜCHER, TH., CZOK, R., GARBADE, K. H., MAYER-ARENDT, E. & PFLEIDERER, G. (1953), *Z. Naturforsch. B* 8, 555—577. — 11. ALLEN, R. C., MOORE, D. J. & DILWORTH, R. H. (1969), *J. Histochem. Cytochem.* 17, 188—189. — 12. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A. (1953), *Biochim. Biophys. Acta* 10, 193—194. — 13. SCHEIDEGGER, J. J. (1955), *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 7, 103—110. — 14. OUCHTER-
LONY, Ö. (1958), *Progr. Allergy* 5, 1—78. — 15. KRASSNITZKI, O., PESENDORFER, F. & WEWALKA, F. (1970), *Deut. Med. Wochenschr.* 95, 249—253. — 16. KLEY, S. (1972), *Deut. Med. Wochenschr.* 97, 1547—1549. — 17. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. (1961), in *Experimental Immunochemistry*, pp. 122, 798 Thomas Publ., Springfield/Ill. — 18. RAJESWKI, K., ROTTLÄNDER, E., PELTRE, G. & MÜLLER, B. J. *Exp. Med.* 126, 581—606. — 19. PFLEIDERER, G., LINKE, R. & REINHARDT, G. (1970), *Comp. Biochem. Physiol.* 33, 955—967. — 20. LAURELL, C. B. (1966), *Anal. Biochem.* 15, 45—52. — 21. MANCINI, G., VARMAN, J. P., CARBONAR, A. O. & HEREMANS, J. F. (1963), *Coll. Prot. Biol. fluids* 11, 370—373. — 22. ABELEV, G. I., ASSEKRITOVA, I. V., KRAEVSKI, M. A., PEROVA, S. D. & PEREVODCHIKOVA, M. I. (1967), *Int. J. Cancer* 2, 551—558. — 23. BOURGEAUX, C., MARTIN, F., CABANNE, F., AUPECLE, P. & GUERRIN, I. (1971), *Presse Méd.* 79, 1589—1590. — 24. HULL, E. W., MOERTEL, C. G. & CARBONE, P. P. (1969), *Clin. Res.* 17, 403—409.

Prof. Dr. med. Frank-Günther Lehmann
Dorothee Lehmann
Med. Klin. d. Univ.
3550 Marburg/Lahn
Mannkopffstr. 1